

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09991

研究課題名（和文）網膜色素上皮細胞の脂質プロファイルとドルーゼン形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Lipid profiles of retinal pigment epithelial cells and the mechanism of Drusen formation.

研究代表者

池田 華子（Ikeda, Hanako）

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：20372162

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：黄斑変性患者および健常者からiPS細胞を樹立、網膜色素上皮細胞に分化誘導させた。形態や網膜色素上皮細胞特異的な遺伝子の発現に、大きな差異はなかった。貪食能は、疾患由来の網膜色素上皮でやや低下しているようであった。網羅的脂質解析の結果、患者由来の網膜色素上皮細胞では、健常者由来の網膜色素上皮細胞と比較して、細胞内脂質の組成が大きく異なる事が明らかになった。また、メンブレン上での培養により、患者由来網膜色素上皮細胞では、ドルーゼン様の沈着物が形成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在日本において加齢黄斑変性は中途失明の原因の一つであり、患者数は増加の一途をたどっている。本研究にて、黄斑変性患者由来の網膜色素上皮細胞では、健常者由来の網膜色素上皮細胞と比較して、細胞内脂質の組成が大きく異なる事が明らかになった。詳細な検討により、ドルーゼン形成のメカニズムが詳細に解明されれば、発症予防治療法の開発につながり、学術的、また社会的な意義は非常に大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：iPS cells were established from patients with macular degeneration and healthy subjects and induced to differentiate into retinal pigment epithelial cells. There were no significant differences in morphology or expression of retinal pigment epithelial cell-specific genes. Phagocytosis was slightly decreased in disease-derived retinal pigment epithelium. Comprehensive lipid analysis revealed that the intracellular lipid composition of retinal pigment epithelial cells derived from patients differed significantly from that of retinal pigment epithelial cells derived from healthy individuals. In addition, culture on membranes showed that patient-derived retinal pigment epithelial cells formed Drusen-like deposits.

研究分野：眼科

キーワード：黄斑変性 ドルーゼン iPS 網膜色素上皮 脂質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在日本において、加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration, AMD) は中途失明の主な原因の一つであり、人口の高齢化に伴い、患者数は増加の一途をたどっている。脈絡膜新生血管を伴う滲出型と、新生血管を伴わず、網脈絡膜萎縮をきたす萎縮型ともに、AMD の発症には、網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) の脂質代謝をはじめとする加齢変化が重要であるとされる。ドルーゼンは脂質を中心とした老廃物の蓄積物と考えられ、RPE の加齢変化を示す所見とされている。一方、AMD の類縁疾患である Malattia Leventinese (常染色体優性放射状ドルーゼン、autosomal dominant radial drusen: ADRD) では、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) 遺伝子変異によって、20 代以降にドルーゼンが生じる。ともに、ドルーゼンの長期にわたる蓄積の結果、脈絡膜新生血管や網脈絡膜萎縮をきたし、中心視力の低下がおこる。

新生血管を伴う滲出型に対しては、光線力学療法や抗 VEGF 硝子体内注射など、その治療法の発展には目を見張るものがある。しかし、これらの治療は新生血管消退を目指すものであり、一旦脈絡膜新生血管が生じると、血管が消退しても良好な視力は期待できない。また、近年増加傾向にある萎縮性黄斑変性や、ADRD の黄斑変性に対しては、有効な治療法が存在しない。したがって、新生血管や変性が起きる前段階、つまりドルーゼン蓄積期の進行メカニズム解明ならびに進行抑制・治療こそが今後の課題である。

RPE 細胞は、日々、視細胞の外節を貪食・消化し、リサイクルを行っている。外節は脂質二重膜が積み重なった構造をしており、RPE 細胞は、体内でも脂質の代謝が最も盛んな細胞の一つである。しかし、患者から RPE のサンプリングを行う事は不可能であり、その脂質プロファイルや加齢による変化はこれまで明らかにされてこなかった。

Induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) は、成人皮膚細胞や血液細胞に若返り遺伝子を導入し、多分化能を獲得させたものである。ヒト iPS 細胞から RPE 細胞への分化誘導法 (参考文献) を用いることで、患者由来の RPE を得ることが可能となっている。iPS 細胞から分化させた RPE を用いることで、これまで不可能であった患者の RPE の機能解析や病態解明が可能になった。

2. 研究の目的

本研究では、大きなソフトドルーゼンを多数持つ AMD 及び ADRD 患者から樹立した iPS 細胞由来の RPE 細胞を用い、

- 1) 患者・健常人 iPS 由来の RPE 細胞内の脂質プロファイリングを解明
 - 2) 長期・ストレス負荷培養で加齢を模した状況下の脂質プロファイリングの変化を解明
 - 3) 各 RPE 細胞のドルーゼン形成能と脂質プロファイリングの関連を解明
- し、ドルーゼンの形成メカニズム解明ならびに治療法開発の礎を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 患者 iPS 細胞樹立、iPS 細胞由来 RPE 細胞の分化誘導

AMD 患者 3 名、ADRD 患者 1 名、眼底健常コントロール 2 名から、同意を得て皮膚を採取、iPS 細胞を樹立した。各 iPS 細胞から、すでに我々が確立した浮遊培養法で (SFEB-DL 法: 参考) 分化誘導し RPE 細胞を作成、単層シート状の RPE を得た (iPS-RPE)。

- 2) iPS 細胞由来 RPE 細胞の形態、貪食・消化・ドルーゼン形成能の比較

2-1) 形態評価

各 iPS-RPE に関して、光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いて形態を評価した。

2-2) 遺伝子発現評価。

RPE 特異的な遺伝子発現の差異に関して、Retinal pigment epithelium-specific 65kDa protein (RPE65), Cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP), Bestrophin-1 (BEST1) の発現状態をそれぞれ RT-PCR 及び western blotting で調べた。

2-3) 機能評価

蛍光ビーズ、蛍光標識した牛外節を各 iPS-RPE に貪食させ、FACS 解析にて貪食能を比較検討した。

2-4) ドルーゼン形成能評価

メンブレン上で iPS-RPE 細胞を培養すると、ドルーゼン様の蓄積物が生じる。このドルーゼン形成量の違いを免疫染色を用いて検討した。

3) コントロール・患者 iPS 細胞由来 RPE 細胞のメタボローム解析

LC-MS/MS を用いて、1) で作成した患者・健常者由来 iPS 細胞由来 RPE 細胞及び培養液に関して、脂肪酸代謝物の網羅的ノンターゲット解析を行った。本解析は、研究協力者である理化学研究所統合生命医科学研究センターの有田誠教授らの協力を得て実施した。

4. 研究成果

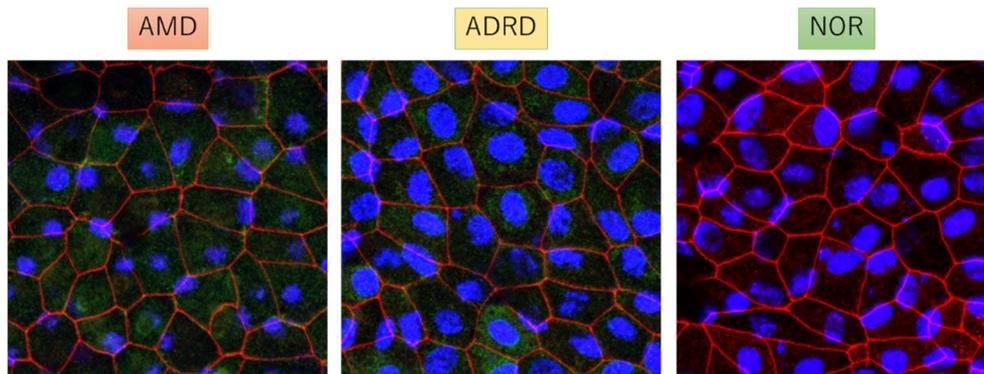
1) 患者 iPS 細胞樹立、iPS 細胞由来 RPE 細胞の分化誘導

AMD 患者 3 名、ADRD 患者 1 名、眼底健常コントロール 2 名から iPS 細胞を樹立した。各 iPS 細胞から、すでに我々が確立した浮遊培養法で分化誘導し RPE 細胞を作成、単層シート状の RPE を得た。

2) iPS 細胞由来 RPE 細胞の形態、貪食・消化・ドルーゼン形成能の比較

2-1) 形態評価

各 iPS-RPE に関して、光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いて形態を評価した。それぞれ、タイトジャンクションマーカーである ZO-1 染色にて、RPE に典型的な六角柱状の細胞であることが確認できた。疾患群による差異は明らかではなかった。



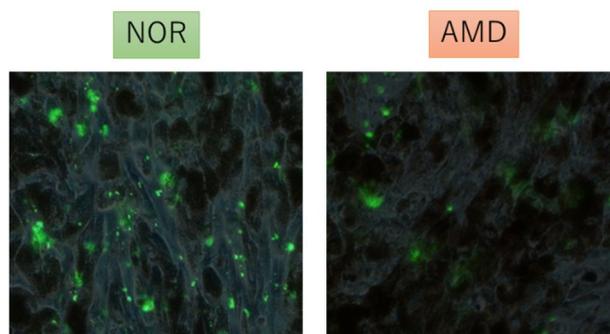
赤：ZO-1, 青：DAPI

2-2) 遺伝子発現評価。

RPE 特異的な遺伝子 RPE65、CRALBP、BEST1 の発現に、患者、健常者由来の iPS-RPE 間で差異はなかった。

2-3) 機能評価

蛍光ビーズを各 iPS-RPE 細胞に貪食させ、FACS にて蛍光強度を測定した。蛍光陽性細胞率や、蛍光強度は、患者群でやや低い傾向にあった。同様に、蛍光標識した牛外節を各 iPS-RPE に貪食させた。FACS による蛍光強度測定により、蛍光陽性細胞の割合は、やはり、疾患群で低い傾向にあった。

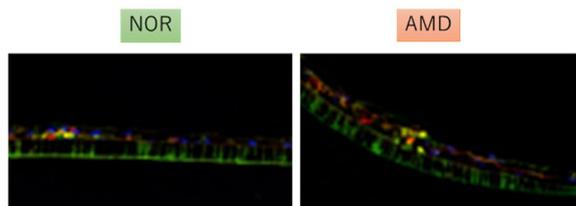


蛍光ビーズ貪食 蛍光顕微鏡撮影

2-4) ドルーゼン形成能評価

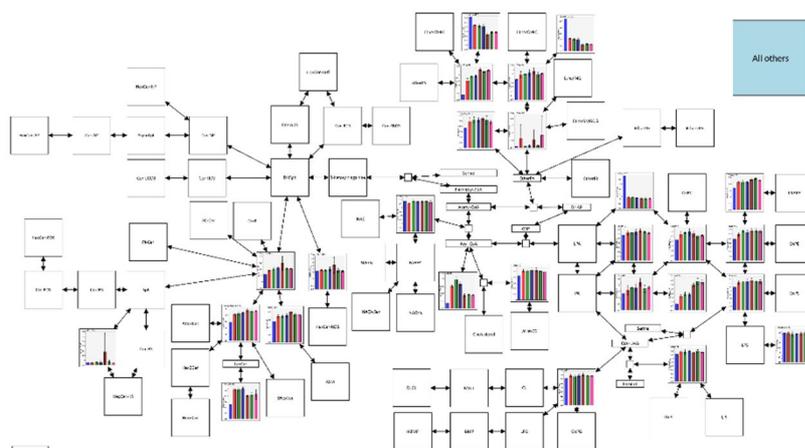
メンブレン上で培養した iPS-RPE 細胞下のドルーゼン様蓄積物を、ApoE、C5b9 の免疫染色で比較検討した。患者由来 iPS-RPE 細胞下には、ApoE、C5b9 染色性のある物質が多いことが明らかになった。

緑 ApoE、赤 C5b9、青 DAPI



3) コントロール・患者 iPS 細胞由来 RPE 細胞のメタボローム解析

LC-MS/MS を用いた脂肪酸代謝物の網羅的ノンターゲット解析の結果、牛外節の貪食により、細胞内の脂質組成が大きく異なること、牛外節貪食下において、患者、健常 iPS-RPE 細胞内の脂質組成が大きく異なることが明らかになった。



細胞培地中の脂質解析

今後、各脂質に関して、より詳細な評価を行っていく予定である。

文献

Osakada F, Ikeda H, et.al. (2008). Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 26, 215-24.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hasegawa Tomoko, Ikeda Hanako Ohashi, Gotoh Norimoto, Iida Kei, Iwai Sachiko, Nakano Noriko, Kakizuka Akira, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of VCP modulators on gene expression profiles of retinal ganglion cells in an acute injury mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61160-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa Tomoko, Ikeda Hanako O., Iwai Sachiko, Sasaoka Norio, Kakizuka Akira, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Hop flower extracts mitigate retinal ganglion cell degeneration in a glaucoma mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21653
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78731-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ikeda Hanako Ohashi, Muraoka Yuki, Hata Masayuki, Sumi Eriko, Ikeda Takafumi, Nakagawa Takayuki, Abe Hiroyasu, Tada Harue, Morita Satoshi, Kakizuka Akira, Yoshimura Nagahisa, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 15
2. 論文標題 Safety and effectiveness of a novel neuroprotectant, KUS121, in patients with non-arteritic central retinal artery occlusion: An open-label, non-randomized, first-in-humans, phase 1/2 trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0229068
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0229068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kido Ai, Tamura Hiroshi, Ikeda Hanako Ohashi, Miyake Masahiro, Hiragi Shusuke, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Nationwide incidence of central retinal artery occlusion in Japan: an exploratory descriptive study using the National Database of Health Insurance Claims (2011?2015)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e041104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjopen-2020-041104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tagawa Miho, Ikeda Hanako Ohashi, Inoue Yumi, Iwai Sachiko, Iida Yuto, Hata Masayuki, Asaka Isao, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 205
2. 論文標題 Deterioration of phagocytosis in induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells established from patients with retinitis pigmentosa carrying Mer tyrosine kinase mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 108503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2021.108503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akagi Tadamichi, Uji Akihito, Okamoto Yoko, Suda Kenji, Kameda Takanori, Nakanishi Hideo, Ikeda Hanako Ohashi, Miyake Masahiro, Nakano Eri, Motozawa Naohiro, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 208
2. 論文標題 Anterior Segment Optical Coherence Tomography Angiography Imaging of Conjunctiva and Intrasclera in Treated Primary Open-Angle Glaucoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 313 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajo.2019.05.008	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyata Manabu, Oishi Akio, Hasegawa Tomoko, Oishi Maho, Numa Shogo, Otsuka Yuki, Uji Akihito, Kadomoto Shin, Hata Masayuki, Ikeda Hanako Ohashi, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 60
2. 論文標題 Concentric Choriocapillaris Flow Deficits in Retinitis Pigmentosa Detected Using Wide-Angle Swept-Source Optical Coherence Tomography Angiography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 1044 ~ 1044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.18-26176	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 軟骨保護用の医薬組成物	発明者 西谷江平、垣塚彰、池田華子ほか一、岩井祥子、斉藤元央、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/039896	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 腎臓保護用の組成物	発明者 桑原 孝成、垣塚彰、池田華子ほか	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-194628	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大石 明生 (Oishi Akio) (50572955)	京都大学・医学研究科・特定病院助教 (14301)	2019年のみ、所属は当時
研究分担者	岩井 祥子 (Iwai Sachiko) (00768905)	京都大学・医学研究科・特定研究員 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------